

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 38 842 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 42 38 842.2  
㉑ Anmeldetag: 17. 11. 92  
㉒ Offenlegungstag: 19. 5. 94

97F-237  
㉓ Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 12 P 1/00**  
C 12 N 1/10  
// C 12N 9/16,9/48,  
9/24,9/38,9/40,C12P  
7/66,C12Q 1/00,  
A61K 7/42

AJ

DE 42 38 842 A 1

㉔ Anmelder:  
Tiedtke, Arno, Prof. Dr., 4400 Münster, DE; Kiy,  
Thomas, Dipl.-Biol., 4400 Münster, DE

㉕ Erfinder:  
gleich Anmelder

㉖ Hochzelldichte Fermentation von Ciliaten zur Gewinnung von Naturstoffen

DE 42 38 842 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNESDRUCKEREI 03. 94 408 020/461

5/47

Es ist bekannt, daß einige Ciliatenspezies, wie etwa Tetrahymena, bestimmte Enzyme in das umgebende Medium sezernieren (Müller, 1972). Die sezernierten Enzyme wurden bisher nur im Labormaßstab gewonnen, wobei einfache batch-Fermentationen durchgeführt wurden. Dabei werden z. B. 500-ml-Erlenmeyerkolben, die 130 ml frisches Medium enthalten, mit Zellen angeimpft (Blum, 1975). Nach dem Erreichen der Stationärphase werden die Zellen durch Zentrifugationschritte von dem enzymhaltigen Medium abgetrennt. Bisher wurden Zuchtmedien verwendet, die sich z. B. aus Proteose Pepton und Hefe Extrakt oder Leber Extrakt zusammensetzen und die Nährstoffe in überwiegend gelöster Form enthalten. Bei dem beschriebenen Verfahren liegt die maximale Zellkonzentration unter  $10^6$  Zellen/ml (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973) und die Generationszeit bei über 2 h, wenn etwa Tetrahymena thermophila fermentiert wird. Die maximalen Enzymausbeuten betragen z. B. 100 mU  $\beta$ -Hexosaminidase und saure Phosphatase pro ml Medium. Obwohl man weiß, daß Ciliaten wie z. B. Tetrahymena ein besseres Wachstum aufweisen, wenn die Nährstoffe in partikulärer statt gelöster Form vorliegen (Rasmussen & Modeweg-Hansen, 1973), wurde solch ein axenisches Zuchtmedium bisher nicht beschrieben.

Der im Patentanspruch 1 angegebenen Erfindung liegt das Problem zugrunde, daß die Ciliaten sich bei den bisher verwendeten Zuchtverfahren und -medien relativ schlecht vermehren ließen, woraus niedrige Ausbeuten bezüglich der Biomasse und wertvoller sezernierter Naturstoffe wie Enzyme, Melanine und Extrusomen resultierten. Weiterhin mußten die Zellen bisher in arbeitsaufwendigen Zentrifugations- bzw. Filtrationsschritten vom enzymhaltigen Kulturmedium abgetrennt werden.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch 1 aufgeführten Merkmale gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß Ciliaten der Gattungen Tetrahymena und Colpidium sich sehr schnell vermehren (Generationszeit: 1,4 h) und Zelldichten von über  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (entspricht einer Trockenmasse von etwa 50 g/l) erreichen, wodurch eine enorm hohe Produktivität bezüglich der sezernierten Substanzen gegeben ist. Der kontinuierliche Austausch des Kulturmediums über ein Membransystem, das die Zellrückhaltung im Fermenter gewährleistet, ermöglicht es kontinuierlich über Monate große Mengen an Enzymen, Melaninen und Extrusomen zu gewinnen. Weitere Vorteile sind, daß dieselben Zellen über einen langen Zeitraum zur Produktion genutzt werden können, und daß aufwendige Arbeitsschritte zur Abtrennung des Mediums von den Zellen entfallen. Das gute Wachstum (und somit die hohen Ausbeuten) wird durch den Einsatz eines Kulturmediums, das im Gegensatz zu den bisher üblichen axenischen Medien die Nährsubstanzen überwiegend in partikulärer Form enthält, ermöglicht. Dies wird erreicht durch die Verwendung von Magermilchpulver als Nährsubstrat. Durch Autoklavieren des Mediums wird bewirkt, daß das Milcheiweiß koaguliert und aus der löslichen in die partikuläre Form übergeht. Dieses Kulturmedium enthält im wesentlichen Magermilchpulver und kostet somit nur Bruchteile des bislang verwendeten PPYS Mediums, was als Vorteil für eine kommerzielle Nutzung des Systems gesehen werden muß.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist dem beigelegten Manuskript einer Publikation, die am 19.11.92

## Ausbeuten

1 ml zellfreier Überstand aus unserem Verfahren enthält ca. 25000 mU saure Phosphatase und 14000 mU  $\beta$ -Hexosaminidase, während 1 ml zellfreier Überstand aus herkömmlichen batch-Verfahren nur etwa 100 mU beider Enzyme enthält. Ähnliche Verhältnisse findet man bei allen weiteren Enzymen. Für 50000 mU  $\beta$ -Hexosaminidase (aus Rinderniere) der Fa. Boehringer Mannheim zahlt man 274,- DM und für 60000 mU saure Phosphatase 70,- DM. Weiterhin lassen sich mit unserem System große Mengen PDE I, die heute noch aus Schlangengiften gewonnen wird, PDE II, Protease, alpha-Mannosidase, alpha-Glucosidase,  $\beta$ -Glucosidase, Phospholipase C, Phospholipase A<sub>1</sub> u. a. Enzyme produzieren (siehe auch Abb. 1). Durch den Einsatz geeigneter Mutanten konnten außerdem große Mengen Melanin gewonnen werden.

## Anwendungsbeispiele

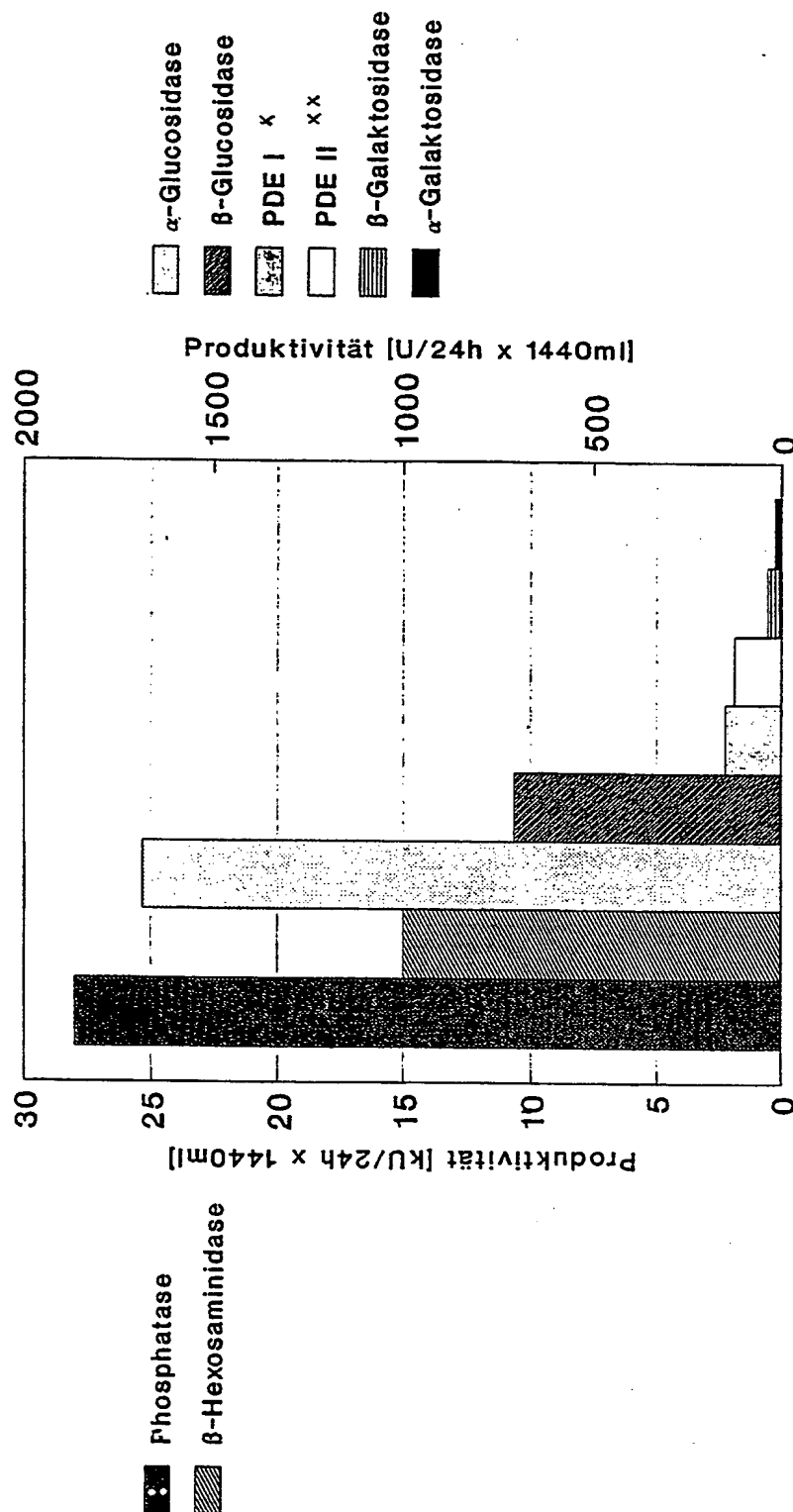
Die genannten Enzyme sind von kommerzieller Bedeutung und finden Verwendung in Bereichen der Diagnostik, Lebensmittelchemie, Analytik und Molekularbiologie. Da geeignetere Quellen bisher nicht zur Verfügung standen, wird die PDE I z. B. noch aus Schlangengift, die PDE II aus Kalbssmilz, die  $\beta$ -Hexosaminidase aus Rinderniere und die  $\beta$ -Glucosidase aus Süßmandeln gewonnen. Melanine werden aufgrund ihrer Eigenschaft, UV Strahlen zu absorbieren, zur Herstellung von Sonnenschutzcremes eingesetzt.

## Patentanspruch

Verfahren zur Hochzelldichte-Fermentation von Ciliaten (Gattungen: Tetrahymena, Colpidium) auf axenischem Medium insbesondere zur Gewinnung von sezernierten Naturstoffen **dadurch gekennzeichnet**, daß die Ciliaten kontinuierlich mit einem billigen Nährmedium versorgt werden, das die Nährstoffe in überwiegend partikulärer Form enthält, während das mit wertvollen Naturstoffen angereicherte, verbrauchte Kulturmedium, bei gleichzeitiger Rückhaltung der Zellen im Zuchtgefäß, über ein Polypropylenmembransystem geerntet wird.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -



x PHOSPHODIESTERASE I (PDE I)  
xx PHOSPHODIESTERASE II (PDE II)

Abb. 1: